PAT-NO:

JP407265097A

DOCUMENT-IDENTIFIER:

JP 07265097 A

TITLE:

DETERMINATION OF IRON

PITEN-DATE:

October 17, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME UMEMOTO, MASAO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

UMEMOTO MASAO

COUNTRY N/A

APPL-NO:

JP06096864

APPL-DATE:

March 30, 1994

INT-CL (IPC): C12Q001/26

# ABSTRACT:

PURPOSE: To enable high-sensitivity determination of iron under conditions simply in a shortened time by generating hydrogen peroxide an enzyme reaction, oxidizing divalent iron into trivalent iron with hydrogen peroxide in the presence of a reducing agent and determining the corresponding change in the hydrogen peroxide.

CONSTITUTION: An aqueous chelate such as EDTA or the like is added sample from living body to release iron from iron-binding proteins such as transferrin, albumen or globulin. Then, 4-aminoantipyrine, ascorbic acid as a reducing agent and glucose oxidase are added, then glucose and peroxidase are admixed thereto to liberate hydrogen peroxide so that the divalent iron is

oxidized into the trivalent iron by the hydrogen peroxide in the presence of a reducing agent. Then, the change in hydrogen peroxide corresponding to the iron oxidation is determined with the peroxidase-4-aminoantipyrin system whereby high-sensitive determination of iron in a sample can be done.

COPYRIGHT: (C) 1995, JPO

# (19)日本国特許庁 (JP) (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出頭公開番号

特開平7-265097

(43)公開日 平成7年(1995)10月17日

技術表示循所 FI 鐵則配号 户内格现番号 (51) Int.CL\* 6807-4B C12Q 1/26

審査請求 未請求 請求項の数5 書面 (全 6 頁)

(71)出版人 593218716 特局平6-96864 (21)出廣番号 梅本 雅夫 埼玉県北高節郡杉戸町宿地五丁目20番16号 平成6年(1994)3月30日 (22)出題日 (72)発明者 掛本 雅夫 埼玉県北京施耶杉戸町清地五丁目20番16号

## (54) [発明の名称] 鉄の定量方法

(57) [要約] [目的] 高感度な鉄の定量法を提供する 【構成】水性媒体中、2価鉄イオンを含む試料と、選元 利共存下、オキシダーゼ反応により生成させた過酸化水 素とを接触反応させ、対応する過酸化水素変化量をオキ シダーゼ検出反応等、高感度な過酸化水素検出法により 定量することを特徴とする鉄の測定方法。

【特許請求の範囲】 【請求項1】 還元剤の共存下に2価鉄から3価鉄への 酸化を行わせそれに対応する変化量を定量する鉄の分析

【請求項2】 過酸化水素を発生させ、還元剤の共存 下、過酸化水素による2価鉄から3価鉄への酸化を行わ せ、対応する追談化水素量の変化量を定量する請求項1 に記載する鉄の分析法

【請求項3】 過酸化水素発生法がオキシダーゼ酵素反 応であり、過酸化水素定量方法がオキシダーゼ検出反応 10 である請求項2に記載する鉄の分析法

【請求項4】 鉄キレート剤を共存させる請求項2及び 請求項3に記載する鉄の分析法 【請求項5】 トランスフェリン、アルブミン、グロブ

リン等の鉄結合タンパクから、鉄を水性キレート剤を用 いて遊離させオキシドレゼクターゼ酵素反応を行う鉄の 定量方法

## 【発明の詳細な説明】

[0001]

「産業上の利用分野」本発明は、酵素反応により発生さ せた過酸化水素が還元剤共存下2価鉄イオンにより増幅 して消費されることを利用した極めて高感度な鉄の定量 方法に関する。

[00002]

【従来の技術】微量鉄イオンの分析法としては、ビビリ ジン、0-フェナントロリン、バソフェナントロリン、 トリピリジルトリアミン、チオグリコール酸、チロンな ドを用いる比色法がある。しかし、これらの方法は有機 溶媒抽出を利用したり、反応、発色の条件が温和ではな いため、酵素反応のような、簡例かつ迅速な制定には不 30 の過酸化水条消費速度は遅い。 適である。酵素反応を用いる鉄イオンの測定法として は、アコニターゼが鉄イオンにより活性化されることを 利用した方法が報告されている(第32回日本臨床化学 会年会要旨集p56b)。

【0003】2価鉄イオンが過酸化水素を選元すること は周知のことであり、このことを利用して2価鉄イオン を求めることができる。電気化学的に鉄を測定する方法 があり、鉄のターロメトリーとして古くから知られてい る。しかし、これらの方法では感度は悪く微量の鉄の分 析には適さない。これらの方法以外により、鉄を高感度 40 に検出する方法の発明が求められている。

### [0004]

【発明が解決しようとする課題】最終液中濃度としてp pt(ng/ml)という数量の鉄イオンを検出するに は、2価鉄イオンによる過酸化水素還元作用の増幅と対 応する微量の過酸化水素の変化量を高速度に検出する方 法が用いられなければならない。

#### (00051

[課題を解決するための手段] 本発明は、水性媒体中、 酵素反応又は電気化学的方法により過酸化水素を発生さ 50 て、かつ基質、酵素共に長期安定であるものとしては、

せ、還元剤の共存下発生させた過酸化水素と2価鉄とを 反応させ、過酸化水素の変化量を過酸化水素発色反応又 は霊気化学的方法により検出することを特徴とするもの である。本発明が対象とする鉄温度は極めて微量である ため、単に2価鉄により消費される過酸化水素量はわず かであるため、電気化学的及び吸光光度法等では検出で きず、微量鉄の測定方法としては無効である。本発明 は、2価鉄に微量の還元剤を共存させれば、協同作用的 に過酸化水素が消費され、高感度に鉄を定量できること

2

を見いだしたことにもとずく。 【0006】ここに、水性媒体とは緩衝液、生理食塩水 等の水を含有する液を表し、緩衝液としてはトリス(ヒ ドロキシメチル) アミノメタンー塩酸緩衝液、リン酸緩 衛液。グッド緩衝液、バルビタール緩衝液等が代表的で ある。鉄の還元剤としてはFe2+-Fe3+系の酸化 還元電位の見掛け電位より低いものを用いる。 アスコル ビン酸、塩酸ヒドロキシルアミン、チオ硫酸ナトリウ ム、チオグリコール酸、ヒドロキノン、硫酸ヒドラジン などがある。特にヒドロキシルアミンとその塩、ヒドラ ジンとその塩は、ベルオキシゲーゼ反応を阻害せず、か 20 つ、過酸化水素の消費反応が遅いので、優れた還元剤で ある。又、アスコルビン酸はアスコルビン酸オキシダー ゼにより消費できるため、過酸化水素生成一発色反応の 前に大部分を消費することができる。なお、ヒドロキシ ルアミンもヒドロキシルアミン脱水素酵素により消去で きる。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド週元体

(NADH) とフェリシアンイオンからジアフォラーゼ 反応により生成したフェロシアンイオンを還元体として 用いることもできる。この場合は、フェロシアンイオン

[0007]過酸化水素生成反応としては、電気化学的 な方法もあるが基質と酸素により過酸化水器を生成する オキシダーゼ酵素反応が最も適している。この場合、直 接過酸化水素を生成しないが、最終的にオキシダーゼ酵 素反応に結びつけられるすべての酵素反応が含まれる。 オキシグーゼ酵素反応のうち、生体試料等に含まれる物 質を基質とし、よく用いられる方法としては、グルコー スオキシダーゼ法、コレステロールオキシダーゼ法、ガ ラクトースオキシダーゼ法、グリセロールオキシダーゼ 法、尿酸オキシダーゼ (ウリカーゼ) 法などがある. 一 般には用いられないがアミノ酸オキシダーゼ法、アミン

オキシダーゼ法、アルデヒドオキシダーゼ法、グルタミ ンオキシダーゼ法、グリコールオキシダーゼ法、ジヒド ロオロット酸オキシダーゼ法、ビルビン酸オキンダーゼ 法、ヘキソースオキシダーゼ法、モノアミンオキシダー ゼ法、ラトステロールオキシダーゼ法、リジンオキシダ ―ゼ法、シュウ酸オキシダーゼ法、ヒドロキシ酸オキシ ゲーゼ法等がある。

【0008】生体試料中には存在しないか、微量であっ

コリンオキシダーゼ法、グリセロールー3-リン酸オキ シダーゼ法、キサンチンオキシダーゼ法がある。

[0009] 基質があらかじめ試料中に存在する場合に ついては、基質をあらかじめ他の酵素反応により消去し 別のものに変化させてから、上述の過酸化水業生成反応 を行うか、基質を多量に存在させ、試料に含まれる基質 の増加による影響をなくするか等の方法がある。これら の方法は、酵素的分析法では確立されており、よく利用 されている。上述した過酸化水染生成を行う酵素反応は に微量のFe2+によっては阻害されない。

[0010]生成した過酸化水素を高感度に検出するに は、電気化学的な方法[鈴木周一編、イオン電極と酵素 常極 p86~106、講談社サイエンティフィック] の他にオキシダーゼ検出反応(カタラーゼ共役系、ベル オキシダーゼ共役系)、化学発光法等がある。カタラー ゼ共役系はHantzsch反応を利用する方法、4-アミノー3ーヒドラジノー5ーメルカプトー1,2,4 ートリアゾール又は3-メチルー2-ベンゾチアゾリン ヒドラジンを用いる方法がある。ペルオキシダーゼ共役 20 系は、多くの高感度発色試薬が開発されており、それら は["臨床化学実践マニュアル", 検査と技術増刊号。 1993年、21巻、p23, 医学書院] に一覧表とし て記載されている。それらの発色試薬のモル吸光係数は 1×104~8×104であり、最小のモル吸光係数を 有する4-アミノアンチピリン (モル吸光係数1×10 4) 試案であっても5ppb (10ng/ml) の鉄を 十分な感度で測定できる。大きなモル吸光係数を有する N-スルフォプロビルアミンでは、ppt (pg/m 1)の鉄が十分測定可能である。このような大きなモル 30 吸光係数を有する発色試薬と還元剤共存下化Fe2 + に よる過酸化水素消費反応を組み合わせることにより、微 量の鉄を定量することが可能である。以上のようなトリ ンダー発色試薬の他に、酸化造元発色試薬も用いること ができるが、Fe3 \* をFe2 \* に選元する還元剤の影 響をうけるので、鉄道元剤をあらかじめ消去した後用い ることができる。この試薬については同仁化学研究所カ タログDOJIN17、p10に記載されている。感度 的に劣るが、よう素イオン又はフェリシアンイオンと過 酸化水素との反応を用いることもできる。以上のような 40 分光学的方法の他に、過酸化水素電極法、ベルオキシダ 七固定化酵素電極法が高感度検出法として用いること ができる。

[0011] 過酸化水素がFe2+により消費されその 変化量を精度良く検出するには、過酸化水素量が検出反 応にとって適切量でなければならない。本発明では過酸 化水素をオキシダーゼ酵素反応により発生さぜる方法を 採用1.ている。これによれば、過酸化水素の生成量を、 福酵素、蒸賃量等を制御することによりいかようにでも 羽節可能であること、過酸化水染生成速度も酵素量、補 50 還元額は後に加えてもよい。オキシダーゼ反応により過

酵素量、活性化剤の量等を制御することにより調節可能 であるという優れた利点を有している。

【0012】次に、生体試料のように鉄が蛋白(トラン ズフェリン、アルブミン等) と結合している場合、キレ 一ト剤を用いて鉄を蛋白から遊離する。このような試料 に対し本発明ではキレート剤を用いる方法を重要な構成 要件としている。というのは、鉄を分子構成要素(補欠 因子)とする酵素を用いる鉄の定量方法では、そのよう なキレート剤を加えると失活し反応が進行しなくなる

Cu²+によって阻害されるものがあるが、うまい具合 10 が、本発明で用いるオキシダーゼ検出反応では鉄を補酵 妻としていないので失活しないため、キレート剤を共存 させることができる。キレート剤を共役させることによ り、従来、鉄を蛋白から遊離するために必要を操作であ るpHを酸性にしたり、除蛋白するという過程が不要と なり、測定操作の大幅な簡略化、測定系の自由な組み合 わせが可能となる。さらに、重要な点は、本発明のオキ シダーゼ検出反応といったオキシドレダクターゼ反応 が、2価鉄キレートを共存させても遊離の2価鉄イオン と同様に進行することを見いだした点にある。この現象 を利用すれば、オキシダーゼ反応以外のオキシレダクタ ーゼ反応によって血消中の鉄の定量が可能となる。その ような酵素反応としてはフェロオキシダーゼI、フェロ オキシダーゼ「」、リボアミドレグクターゼがある。 又、2価鉄イオンが阻害するオキシドレダクターゼも同 様にキレート剤共存下、阻害法によって鉄の定量が可能 であり、これにはコリンデヒドロゲナーゼなどがある。 【0013】鉄キレート剤としては、エチレンジアミシ

四酢酸、トランス-1, 2-シクロヘキサンジアミン-N. N. N' N' - 四酢酸、ジエチレンジアミン五酢 酸、グリコールエーテルジアミン四酢酸、トリエチレン テトラミン六酢酸、ジアミノアロバノール四酢酸、ヒド ロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、ジアミノプロバ ン四酢酸等が安定度定数が大きく好ましい。ニトロ三酢 酸、ジヒドロキシエチルグリシン、イミノ三酢酸、ヒド ロキシエチルイミノ二酢酸、エチレンジアミンニプロビ オン酸などは安定度はやや小さいが用いることができ る。このようなキレート試薬のみならず、水溶性の鉄結 合試察、例えばバゾフェナントリンスルホン酸ナトリウ

ムーフェロンなども用いることができる。 【0014】以下に本発明の実施態様の骨子を説明す る。本発明の実施態様は過酸化水素生成過程と検出過程 の2過程上り構成される。試料としては、上水、廃水、 牛体試料(血液、血清、血しょう、尿、ヘモグロビンな ど)、食品など広範囲を対象とすることができる。まず 水性媒体に還元剤O、01~1mg/mlを加え、次に 鉄を含む試料を加え、0~5分間8~50℃でインキュ ベートし (アスコルビン酸、塩酸ヒドロキシルアミンの 場合け曖昧に得元されるので、インキュベートは不要で ある) 3価鉄を2価鉄に還元する。2価鉄のみの場合は 酸化水器を生成する方法を用いる場合は、オキシダーゼ かその基質をこのときの水性媒体に共存させてもよい。 例えば、塩化コリン等を0、1~10mg/m1加えて おく。又、発色反応の基質を加えておいてもよい。例え ば、4-アミノアンチビリン等を0.05~1mg/m 1を加えておく、次に残りの基質、オキシダーゼ反応の 酵素及び発色反応の酵素を含む水性媒体を上述の液に加 え、生じる吸光度変化量を求め、鉄の量を求める。オキ シダーゼ酵素としては0.2~20U/m1、発色反応 としてベルオキシダーゼをO. 1~20U/m Iを用い 10 る。この酵素量は還元剤の種類に依存し、塩酸ヒドロキ シルアミン、硫酸ヒドラジンなどの場合は少量でよい。 弱りの基質としては、N-エチルーN-(3-メチルフ ェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン0.1~ 2mg/m1を加える。この過酸化水素生成、発色反応 は酵素反応として適切な条件であるpH6~7.5.温

【0015】水性媒体のpHとしては、2価鉄が酸素に より3価鉄に酸化されるのを防ぐため、3価鉄から2価 鉄への遊元は酸性とするのがよい。この場合、弱い接衝 20 作用の水件媒体とし(水のみでもよい)、次の反応過程 における強い緩衝液により、反応に適切なpHとなるよ うにする。過酸化水素生成及び検出過程を酵素反応で行 う場合は接貨液のpHは5~8とし、特にpH6.0~ 7. 5が望ましい。

度8~50℃で行う。

[0016] 文献によるとアスコルビン酸は6mg/d 1の割合で加えるのが望ましいとあり、3価鉄を還元 後 オキシダーセ反応を行う。アスコルビン酸はアスコ ルビン酸オキシダーゼを発色反応系に加えることによ り、アスコルビン酸が消去されると同時に発色がおき る。この場合、微量に残存するアスコルビン酸は還元剤

【0017】オキシダーセ反応は、一定量の過酸化水素 を生成させた後、検出過程を行う場合と、両方を同時に 行う場合とがある。前者は試料中に共存する過酸化水素 消費物質が多量に存在していても、正確に鉄が測定でき るという画期的な利点を有する。すなわち、試料中に例 えばアスコルビン酸、尿酸、ビリルビンなどの還元性物 質が多量に存在していても、鉄の還元剤を加えないでー

と) て2価値と協同効果を発揮する。

連の反応を行えば鉄は反応に関与しないためそのブラン 40 クのみが完量される。次に、鉄の還元剤を加えて一連の 反応を行い、両者を差し引けば鉄の定量ができる。この 方法は、血清、血しょうのようにアスコルビン酸などが 共存していても酵素作用により鉄は3価として存在する 試料に対して極めて有用である。 [0018] 生体試料については、オキシグーゼ反応に

おける基質が試料中に含まれている場合はその消去反応 を行う必要がある。例えばグルコースオキシダーゼを用 いる場合は、グルコースオキシダーゼをもって、内因性

6 去する。ヘキソキナーゼを用いる場合は、オキシダーゼ 反応と無合するため、マグネシウムキレート削等の阻害 剤を加えて失活させる必要がある。 本発明における鉄キ レート剤の多くはマグネシウムキレートともなるので、 キレート剤の利用は極めて優れた方法といえる。

【0019】鉄を蛋白から分離させるキレート剤はオキ シダーゼ反応と共存させてもよいし、次のオキシダーゼ 検出反応時に共役させてもよい。後者の場合は、鉄をあ らかじめトランスフェリン、アルブミン等から分離させ ておいてもよい。この目的には、液のpHを2~4とす

【0020】他の方法及び、他の酵素法で困難であった 血清の発共会能も本発明によれば簡単に測定できる。そ の原理を以下に示す。まず、上述した方法に従い、鉄キ レート剤を共存させて、血清鉄を定量する。次に、血清 に鉄イオンを過剰量加えて、鉄キレート剤を共存させな いで鉄を定量する。この場合、蛋白は鉄により飽和し、 その分は反応しないので、遊離の鉄イオンのみが測定さ れる。加えた鉄量から血清鉄及び遊離の鉄量を差し引け ば鉄結合能が求められる。

【0021】本発明では強い還元剤であるアスコルビン 酸等を用いた場合、銅の影響を若干うける。銅について は試料中の鍋と同量の硝酸銅を求めて加えるとよい。も しくは、バソクプロインなど、網と特異的に沈澱物を生 じる試案を加える。尿酸、ビリルビンの還元性物質はそ れぞれ尿酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼによ り消去後発色反応を行う。この場合、消去反応で生成し た過酸化水素は鉄の還元剤によって消失し、発色反応に 影響しない。

#### [0022] 30 【実施例】 【実施例1】

グルゴースオキシダーゼとアスコルビン酸を用いる方法 (1) 鉄検量線用標準液の調製

硫酸第二銖(和光姉菜工業製)を蒸留水で希釈し、塩酸 歩一滴加えた後定容し1、2.5、5、10μg/m1 の鉄(111)検量用標準液を調製した。ただし、別に 原子吸光光度法により、和光純原工業製鉄原準液を対照 として混度を測定し補正係数を求めた。

#### (2) 鉄の定量

試験管に鉄検量用標準液0、10mlをとり、4ーアミ ノアンチビリン〇. 1mg/m1、アスコルビン酸〇. OBmg/ml. 及びグルコースオキシダーゼ (Asp ergillus niger、和光純蒸工業製)30 U/m 1を含む25 m M 酢酸緩衝液 (p H 5) 1. 0 m 1を加え37℃で5分間インキュペートする。次に、N ーエチルーN-(3-メチルフェニル)-N'-サクシ ニルエチレンジアミン (EMSE) 0.6mg/ml, グルコースロ. 05mg/m1、ベルオキシダーゼ(西 のグルコースを消去するか。ヘキソキナーゼをもって消 50 弾わさび由来、和光純薬工業製)10U/ml、アスコ

7 ルビン酸オキシダーゼ(キューリ由来、和光純素工業 製) 10U/m1を含む100mMグッド緩衝液 (HE PES, pH6. 8) 2. 0ml & 55 bb 37 CK インキュベートしたものを上述の溶液に加え、吸光度変 化を分光光度計 (日立製UV3400)で測定した。得 られた検量線を図1に示す。本法では試料中にグルコー スが少量含まれていてもグルコースオキシダーゼにより 分解されて過酸化水素となり、これはさらにアスコルビ ン酸により還元されて星色には影響しない。しかし、グ ルコースが相当量になるとアスコルビン酸が不足し、誤 10 差となる。又、試料にアスコルビン酸が多量に含まれて いる場合も発色反応に影響する。アスコルビン酸オキシ ダーゼは多い程高精度な結果が得られる。

# [0023]

【実施例2】

コリンオキシダーゼとアスコルビン酸を用いる方法 (1) 鉄検量線用標準液の調製

実施例1と同じようにして、125、250、375、 475µg/d 1を調整した。

#### (2) 鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液0、080m1をとり、これ に4-アミノアンチビリン0.1mg/m1、塩化コリ ンO. 4mg/ml、アスコルビン酸O. 12mg/m | を含む20mM酢酸緩衝液 (pH2) 1. 0mlを加 え37℃で5分間インキュベートする。次に、EMSE 0.6mg/d1、ペルオキシダーゼ(西洋わさび由 来、オリエンタル酵母製) 1 OU/ml、コリンオキシ ゲーゼ (アルカリゲネス由来、和光純薬工業製) 6 U/ m1、アスコルビン酸オキシダーゼ8キュウリ由来、和 光純薬工業製) 3 U/m 1を含む200 m Mグッド緩衝 30 液(pH7.0、25℃)を37℃はインキュベートし たもの2m1を上述の溶液に加え、1分後及び3分後の 吸光度を分光光度計(日立製UV3400)で測定し、 両方の吸光度差を計算した。 得られた検量線を図2に示 す。本法では、pH2の溶液と試料を混合し、37℃で 5分間インキュベートすることにより、コロイド状の水 酸化鉄、コロイド状の酸化鉄をも分解し、定量できる。 木法はエンドポイント法であるが、塩化コリンを数倍量 とすることにより速度法が可能である。終点法が速度法 かは塩化コリンと、コリンオキシダーゼ量に依存する。 アスコルビン酸が多量に加えてあるのは、0.5分後の 吸光度を空試験値とするためである。にごりのをい試料 については、アスコルビン酸は少量でよい。

#### 100241

【寒旋例3】

グリセロールー3ーリン酸オキシダーゼと塩酸ヒドロキ シルアミンを用いる方法

## (1) 鉄検量線用標準液の調製

試薬特級硫酸第一鉄(和光純菜工業製)を蒸留水で定容 し、125、250、375μ8/d1の鉄(11) 検 50 ちれる。又、試料中濃度としては図3から吸光度変化

品採用類類消を調製した。

(2) 鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液0.030m1をとり、これ に4-アミノアンチビリン0.3mg/m1、塩酸ヒド ロキシアミン0、15mg/m1、グリセロールー3-リン酸1.5mg/m1を含む水溶液(pH2.5、2 5℃) 1. 0m1を加え37℃にインキュベートする。 次に、EMSEO. 3mg/ml、ベルオキンダーゼ (西洋わさび由来、和光純薬工業製) 0.4U/m1、

- グリセロールー3ーリン酸オキシダーゼ (マイクロオー ガニズム由来、EC1.1.3.21、ベーリンガーマ ンハイム製) 1.5U/ml、エチレンジアミン四酢酸 ナトリウム5mg/m1を含む200mMグッド級衝液 (pH7. 5, 25℃) 2. 0m1をあらかじめ37℃ にインキュベートしたものを、上述の溶液に加え、生じ る吸光度変化(0.2から0.7分の0.5分間)を分 光光度計(日立製UV3400)で測定した。検量線を 図3に示す。次に血溶0.030mLをとり、同様にし て測定した結果、測定値は95mg/d1であった。こ 20 の血清をバゾフェナンスロリン吸光光度法で測定した結
  - 果は92mg/m1であり、極めてよく一致した。
  - 100251

【家施例4】

硫酸ヒドラジンを用いた場合

(1) 鉄検量線用標準液の調製

実施例3と同じであるが、濃度系列を2.4、6.0.

12. 25 µg/m1 blb.

(2)鉄の定量

試験管に鉄検量線用藤準液 O. 1 Om 1をとり、これに 4-アミノアンチセリンO、2mg/m1、塩化コリン Q. 6 mg/m1、硫酸セドラジン飽和水 (20℃) O. O.4 m i /m 1を含む水溶液(pH2.5、25 で) 2. 0 m 1 を加え 25℃で5分間インキュベートす る。次に、EMSE1mg/ml、ペルオキシダーゼ (西洋わさび由来、和光純蒸工業製) 0.5 U/m1、 コリンオキンダーゼ (アルカリゲネス由来、和光純菜工 業製) 1. IU/m1を含む200mMグッド (HEP ES) 製街液 (pH7.0、25C) を25 Cにインキ ュベートしたもの1m1を、上述の溶液に加え、0、5 分後から2.5分後の吸光度を分光光度計(日立製UV 3400)で測定し、両方の吸光度差を計算した、得ら

### [0026]

れた検景線を図4に示す。

【発明の効果】本発明の効果は次のとおりである。本発 明では酵素反応を利用しているので、温和な反応条件で 簡便かつ短時間に鉄の測定が可能である。又、酵素反応 により、適量の過酸化水素を検出と同一の溶液中で発生 させることが可能であり、反応中鉄濃度としてppt

(ng/m1~pg/m1)という極めて高い感度が得

(6)

○.001を与える数PPb (数ル s/d 1) が物出可能である。本発明で用いる都深は焼き細胞素としないので、集中レート制実共存させることが可能であり、鉄を細酵素とする方法に比較して選和、結便な過程にて鉄を定量できる。この特徴を生かし、他の方法、他の時況法では困難であった前常における社会を省をも関する場合でできる。定電位クーロメトリーにより、2価鉄を3価鉄に酸化して鉄を定ますが近において、選定剤を実体させることにより、本発明の解題が来により高速変定が可能となる。本発明の原理は、領、マンガンなど微量の10

10 酸化混元金属の定量に応用できる。

[0027]

【図面の簡単な説明】

【図1】 グルコースオキシダーゼを用いたときの鉄の検 量線

【図2】 コリンオキシグーゼを用いたときの鉄の検量線 【図3】 グリセロールー3ーリン酸オキシダーゼを用いたときの鉄の検量線

【図4】硫酸ヒドラジンを用いたときの鉄の検量線

